

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Just

09/068253

PCT/JP96/03333

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

14.11.96

RECEIVED 17 JAN 1997

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1995年11月17日

出 願 番 号
Application Number:

平成 7年特許願第322402号

出 願 人
Applicant(s):

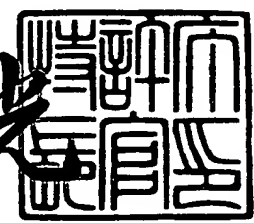
ヘキストジャパン株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1996年12月27日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平08-3093761

【書類名】 特許願

【整理番号】 D0J-4885

【提出日】 平成 7年11月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 37/02

【発明の名称】 軟骨・骨誘導性修復用材料

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 志村 武貞

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキストジャパン株式会社医薬研究開発本部内

【氏名】 鳥山 五月

【特許出願人】

【識別番号】 000113137

【氏名又は名称】 ヘキストジャパン株式会社

【代表者】 ルディガー・バート

【代理人】

【識別番号】 100091731

【弁理士】

【氏名又は名称】 高木 千嘉

【電話番号】 03-3261-2022

【代理人】

【識別番号】 100087930

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐藤 辰男

特平 7-322402

【代理人】

【識別番号】 100080355

【弁理士】

【氏名又は名称】 西村 公佑

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015565

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9103131

【書類名】 明細書

【発明の名称】 軟骨・骨誘導性修復用材料

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因子とを含む軟骨・骨誘導性修復用材料。

【請求項2】 請求項1に記載のポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の構成成分であって、ポリプロピレングリコールの分子量が約1500～4000の範囲にあり、エチレンオキサイド含量が約40～80%/分子の範囲にある軟骨・骨誘導性修復用材料。

【請求項3】 ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の対水溶液濃度が約10～50%からなる請求項2に記載の軟骨・骨誘導性修復用材料。

【請求項4】 骨誘導因子がタンパク質BMP-2である請求項1～3に記載の軟骨・骨誘導性修復用材料。

【請求項5】 骨誘導因子がタンパク質MP52である請求項1～3に記載の軟骨・骨誘導性修復用材料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は骨誘導因子とポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類を含む軟骨・骨誘導性修復用材料に関する。また、本発明はポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の構成成分であるポリプロピレングリコールの分子量が約1500～4000の範囲にあり、エチレンオキサイド含量が約40～80%/分子の範囲にある軟骨・骨誘導性修復用材料に関する。さらに、本発明は、骨誘導因子とポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類とを含む軟骨・骨誘導性修復用材料を投与することにより、温度によってゾルゲル可逆変化を起こし骨誘導因子の薬効を持続させ得る。

【0002】

軟骨・骨の修復方法として、患者自身の自家骨移植以外に骨誘導因子と適当な

担体との組み合わせによる軟骨・骨欠損部の補てつ剤を患部に埋め込む方法が行われている。この場合、外科的手術時に患部を露出し骨誘導因子を含む軟骨・骨修復用材料を直接患部に適用する事が可能であるため、取り扱い易いブロック、スポンジおよびシート等の固体形態が広く用いられてきた。また、ゲルあるいはペースト等の半固体形態も使用できる。これらの固体または半固体形態を可能にする担体としては、例えばステンレスおよびチタン合金等の金属やコラーゲンおよびハイドロキシアパタイト（HAP）またはそれらの混合剤等が利用されている。

【0003】

一方、外科的手術を必要としない骨折や変形関節症などの治療に骨誘導因子を投与する試みがなされている。この投与形態は、非侵襲性投与すなわち注入形態が患者の苦痛を軽減する点で切望されている。しかしながら骨誘導因子の単なる水性液剤をこの形態で投与すると、投与後の薬物の拡散消失が起こるため骨誘導因子を効率よく投与するためには適応患部へ一定期間骨誘導因子を滞留させる必要がある。そこで、投与時には通針性を有する液状であって投与後にゲル状に相変化し患部に骨誘導因子を滞留させ得る担体が考えられている。この担体としては毒性が無く、生体との適合性が良く、生体吸収性が高いものが好ましい。

【0004】

これまでに、骨誘導因子の担体としてはコラーゲンが知られており、良好な生体適合性及び生体吸収性が認められている（特公平5-75425号）。さらに注射可能なコラーゲンとの組み合わせについても知られており、注入可能な軟骨・骨形成材の可能性を有している（特公平7-23322号及び特公平5-53140号）。しかしながら、現在医薬品として利用可能なコラーゲンはその起源がウシあるいはブタなどの天然物由来の材料であるために、その分子量、アミノ酸組成量、保水量等が一定しない。さらに、これらはヒトにとって異種の蛋白質であることに起因する抗原性等の副作用を有する。特に抗原性については、コラーゲンのテロペプチド部位を排除したアテロコラーゲンを使用しても完全に無くすことは出来ない（J. American Academy of Dermatology 10, 638-646 and 647-651, 1984及びJ. American Academy of Dermatology 21, 1203-1208, 1989）。

【0005】

一方、ポリ乳酸やポリ乳酸グリコール酸共重合体等の生体分解性ポリマーを医薬用担体として用いることは知られている（US 5385887号及び特公平6-22570号）。しかし、これら生体分解性ポリマーの形状は固体形態または半固体形態であり、一定形態を保持する点で外科的手術時に適用する材料群に属する。仮に、この様な生分解性ポリマーを用いて注射可能な複合体を作製できたとしても、その製造工程において有機溶剤を使用せざるをえず、有効成分である骨誘導因子の失活が問題となることが容易に予測される。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は上に示したように従来法の不利点ないしは欠点を克服し、生体吸収性が高く、有効成分である骨誘導因子との親和性が良く、温度によってゾル-ゲル可逆変化を起こすことにより骨誘導因子の薬効を持続させ、さらには抗原性等の副作用の少ない軟骨・骨誘導性修復用材料を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは外科的手術を必要としない骨修復方法において、有効成分となる骨誘導因子とその担体との関係について鋭意検討していたところ、ある種のポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類に、生体吸収性が高く骨誘導因子との親和性が良く温度によってゾル-ゲル可逆変化を起こすものがあることを見い出した。本発明者らは、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類水性溶液に骨誘導因子を混合し投与時1℃から30℃においては注入可能な液体であり投与後3分以内に37℃付近でゲル化する骨形成材を作製し、マウス大腿部筋肉内に投与後投与部位に骨誘導因子を保持させ、そこで異所性軟骨・骨形成能があることを見い出し、本発明を完成した。

【0008】

本発明は、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因子とを含む軟骨・骨誘導性修復用材料に関するものである。

【0009】

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類とは、親水性の低いポリプロピレングリコールを疎水基としエチレンオキサイドを親水基として付加した高分子型の非イオン性界面活性剤の総称であり、ポリプロピレングリコールの分子量及びエチレンオキサイドとの混合比を変化させることにより種々の特性を有する界面活性剤を構成することが可能となる。合成可能なポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の組成はポリプロピレングリコールの分子量が900から4000の範囲にあり、総分子中のエチレンオキサイドの重量%が5%から90%である。例えば、旭電化社製のポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類（アデカ^(R)）は、ポリプロピレングリコールの分子量と付加するエチレンオキサイドの重量比により系統的に命名されており、その分類図を図1に示す。

【0010】

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の産業上の利用としては、一般洗浄剤・消泡剤としての使用の他、医薬品の分野において軟下剤、軟膏基材、人工血液、錠剤の被膜、賦形剤、注射剤の可溶化剤および溶解促進剤などに使用されている。特にプルロニックF-68（ポリプロピレングリコールの分子量1750、エチレンオキサイド含量が80%）の溶血防止作用は顕著であることより、血液の体外循環用添加剤として（株）ミドリ十字からエキソコボール^(R)として市販されている。各種動物における毒性試験結果からポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類は毒性及び刺激性が極めて低いことが明らかであり、抗原性等の副作用を示すとの報告もない（フレグランスジャーナル7, 82-87, 1974）。毒性試験の結果を表1に示す。

【表1】

アデカ^(R)プルロニックの急性毒性試験結果

アデカ ^(R) プルロニック	動物種	LD ₅₀ (g/kg)
L-44, L-62, L-64	ラット	5
F-68	マウス	>15
F-68	ラット、ウサギ、イヌ	急性毒性反応なし
P-85	ラット	34.6

【0011】

一方、取り扱い上において、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類は可逆的なゾル-ゲル相変化を示す点においてコラーゲンの温度変化における非可逆的相転移よりも優れる。この性質は相変化を示す温度を至適なポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の選択及びそのポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の水溶液の濃度を変えることにより制御可能である (Int. J. Pharm. 22, 207-218, 1984, EP 0551626A1号)。

【0012】

以上のことから、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類は医薬用担体としての資質に優れており、局所麻酔剤・抗癌剤等の低分子量の薬物と組み合わせたり (Int. J. Pharm. 8, 89-99, 1981及びChem. Pharm. Bull. 32, 4205-4208, 1984)、インターロイキン等の高分子量の生理活性タンパク質を混合する試みが既になされている (Pharm. Res. 9, 425-434, 1992)。

【0013】

本発明は、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因子とを含む軟骨・骨誘導性修復用材料に関しポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の構成成分のポリプロピレングリコールの分子量が約1500~4000の範囲にあり、エチレンオキシド含量が約40~80%/分子の範囲にある軟骨・骨誘導性修復用材料に関する。この構成成分の範囲内であれば本発明のプルロニックの特性である温度によるゾル-ゲル可逆変化を成し得るプルロニックになる。

【0014】

さらに、本発明は、上記記載のポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の対水溶液濃度が約10~50%からなる軟骨・骨誘導性修復用材料に関する。ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類は一般的に水溶液の調製濃度等によりその可逆変化温度が変動することも知られており、上記構成成分の範囲にあるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類では体温付近すなわち37℃近辺では対水溶液濃度約10~90%の範囲でゲル化が起こる。最適な例としてはポリプロピレングリコールの分子量3850、エチレ

ンオキサイド含量が70%であるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類（プルロニックF-127）を対水溶液濃度15～30%で調製する。

【0015】

骨誘導因子（Bone morphogenetic protein：BMP）とは未分化間葉系細胞を軟骨細胞へ誘導し、骨組織を形成する活性をもつ蛋白質である。

【0016】

本発明で用いられる骨誘導因子の例としては、TGF- β ジーンスーパーファミリーに属するBMP-2からBMP-9等の一連のタンパク質、MP52と称されるタンパク質、GDF-5と称されるタンパク質などがあげられるが、これらに限定されるものではない。BMP-2としては、Wangらが報告した遺伝子組み替え技術によりChinese hamster ovary（CHO）細胞を用いて生産したタンパク質BMP-2（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2220-2224, 1990およびUS4877864号）およびMP52としては本発明者らが提案した遺伝子組み換え技術により製造される新規なタンパク質MP52（特願平7-93644号）が特に好適である。この新規なタンパク質は、MP52由来の配列表配列番号1記載のアミノ酸配列をコードするDNA配列のN末端にメチオニンをコードするコドンが付加したDNAを含有するプラスミドを構築し、そのプラスミドを大腸菌に形質転換し、その大腸菌を培養することによって得られるインクルージョンボディを可溶化し、精製することによって得られる単量体のタンパク質を二量体に再生し、これを精製することによって得られる。

【0017】

BMP-2およびMP52を有効成分とする15～30%ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の水性溶液をマウス大腿部筋肉内に注射し、投与後投与部位にMP52を保持させ、そこで異所性軟骨・骨形成能があることを観察した。

【0018】

このようにポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因子との組み合わせからなる軟骨・骨誘導性修復用注入材料は今まで報告されておらず、軟骨・骨修復、特に骨折治療剤として有効である。

【0019】

【実施例】

以下に、実施例および参考例を示して本発明の効果を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0020】

実施例1 BMP-2を含有する軟骨・骨誘導性修復用材料の調製法

アデカ^(R)プルロニックF-127（旭電化工業）は、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類種の中で最も毒性が少ないものの一つとして知られている（製薬工場 6, 875-880, 1986）。このアデカ^(R)プルロニックF-127 3.0gを注射用蒸留水7.0gに氷冷下溶解し、30%アデカ^(R)プルロニックF-127水溶液を調製した。氷冷下アデカ^(R)プルロニックF-127水溶液を96-ウェルタイタープレートに360 μ l/ウェルで分注し、80 μ g BMP-2を含む0.01N HCl 40 μ lを各ウェルに加え混和後、4℃で0.22 μ mのフィルターを透過させて滅菌し、全量約400 μ lのBMP-2注射剤とした（アデカ^(R)プルロニックF-127の最終濃度は27%）。同様にアデカ^(R)プルロニックF-127の最終濃度が10、15、18及び22.5%のBMP-2注射剤も作製した。

その結果、アデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度27%では5℃以下、アデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度22.5%では10℃以下、アデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度10%から18%では25℃以下で注入可能であり、37℃においてゲル状に相変化したアデカ^(R)プルロニックF-127注射剤は、最終濃度が15%以上の製剤であった。従って、室温で液状であり37℃でゲル状を示したアデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度18%の製剤が最適である。

【0021】

実施例2 MP52を含有する軟骨・骨誘導性修復用材料の調製法

実施例1のBMP-2を用いた軟骨・骨誘導性修復用材料の調製方法と同様にアデカ^(R)プルロニックF-127の最終濃度が10、15、18、22.5および27%のMP52注射剤を作製した結果、MP52を用いてもBMP-2の場合

合と同様な注射剤つまりアデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度27%では5℃以下、アデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度22.5%では10℃以下、アデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度10%から18%では25℃以下で注入可能な製剤が得られた。

【0022】

実施例3 イン・ビボ (in vivo) における軟骨・骨誘導性修復用材料投与後のMP52の残存性

麻酔下雄性マウス (ICR系、8週令) の右後足大腿部の筋肉内に、実施例2の処方に¹²⁵I 標識MP52を添加して同様に作製した18、22.5及び27%アデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度の¹²⁵I 標識MP52注射剤を23G針で100μl投与し(約37KBq ¹²⁵I-MP52/部位)、右後足からの放射能消失経過を0.5、2及び8時間後のその残存率を観察した。この時対照として、¹²⁵I-MP52水溶液の注射剤を用いた。結果を表2に示す。

【表2】

アデカ^(R)プルロニックF-127製剤(最終濃度18%
アデカ^(R)プルロニックF-127)または水溶液剤を投
与後の右後足における¹²⁵I-MP52の残存率

時 間 (hr)	プルロニック製剤	水 溶 液 剤
0.5	60.5%	32.7%
2	19.7%	13.8%
8	14.9%	7.9%

表2から、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類を医薬用担体として用いた場合、残存するMP52は単にMP52水溶液を注入した場合に比較して明らかに薬物を保持することが示された。また実施例1の注射剤についても同様の結果が得られた。

【0023】

実施例4 異所性軟骨・骨形成能による薬効試験

麻酔下雄性マウス (ICR系、8週令) の右後足大腿部の筋肉内に、実施例2で作製した18%アデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度のMP52注射剤

を23G針で100 μ l投与した(20 μ g MP52/部位)。この時対照としては、MP52を含有しないアデカ^(R)プルロニックF-127の注射剤を用いた。軟骨・骨形成の判断は、投与2週間後に行った。マウスを頸椎脱臼により屠殺後、投与部位である右後足を切り出し軟X線照射器により撮像を得、投与部位における骨形成の有無を確認した。結果を図2に示す(n=5)。軟X線撮像の結果、アデカ^(R)プルロニックF-127のみ(図2-a)では投与部位である筋肉内に影は認められなかったが、MP52を含有するアデカ^(R)プルロニックF-127(図2-b)では試験した動物の80%以上に明らかな影が確認された。

さらに、軟X線撮影終了後、検体を10%ホルマリン内で保存し、組織学的検査を実施した。図2-bに示した5匹のマウスのうち右端のマウスの組織染色の顕微鏡写真を図3に示す。図3においてフォンコッサ(von-Kossa)染色(図3-a)により影の部分にカルシウムの沈着が観察され、ヘマトキシリン-エオシン(Hematoxylin-Eosin)染色(図3-b)の結果から骨芽細胞、骨基質および骨髄が認められ骨の形成が確認された。また炎症反応は観察されなかった。図中のBM、OBおよびMAはそれぞれ骨基質、骨芽細胞および骨髄を示す。

実施例1で作製した18%アデカ^(R)プルロニックF-127最終濃度のBMP-2注射剤についての同様の試験を実施したところ、同様の結果が得られた。

以上の結果からポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類を骨形成因子の担体として使用する場合の安全性、有用性が確認された。

【0024】

参考例 新規なタンパク質MP52の調製

1. ベクターの作製

(1) 変異型MP52成熟型部分の単離

ヒトMP52 cDNAは、W093/16099に記載されたcDNAを含んだプラスミドベクター(pSK52s)を鋳型DNAとして、成熟型部分のみをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて増幅した。

開始コドンATG周辺のAT含量を上げる事により、目的タンパク質の生産性を上げる方法(M. Nobuharaらの報告(Agric. Biol. Chem., 52(6), 1331~1338

，1988)) に従い成熟型のMP52遺伝子の一部のDNAを置換した。

置換の方法は、配列番号2の順方向PCRプライマーを用い、PCR法で行った。PCRプライマーのDNA配列は、順方向プライマーとして配列番号2、及び逆方向プライマーとして配列番号3記載のDNAを用いた。

PCRは、同じ試験管中で、鋳型DNA(10ナノグラム)、順方向及び逆方向PCRプライマー各々50ピコモル、dNTP(0.2ミリモル)、及びMgCl₂(1.5ミリモル)をTaq DNAポリメラーゼ(5U)と共に加えることにより行った。

各サイクルが、変性(94℃、1分間)、プライマーアニーリング(55℃、1分間)、およびプライマー伸長(72℃、2分間)からなる30サイクルのPCRを行った(以下のPCRはすべてこの条件で行った)。

PCR反応からの生成物を1.5%低融点アガロース(FMC社)中で電気泳動により分離し、配列番号1のアミノ酸配列に相当する約360bpからなるDNAを切り出した(これをフラグメント1とする)。

(2) 本タンパク質の大腸菌発現ベクターの構築

プラスミドの複製数を上げるためには、複製オリジンをpBR系からpUC系に改変した。市販の大腸菌発現ベクターpKK223-3(ファルマシア・バイオテク株式会社より購入)のtacプロモーター領域を制限酵素SspIとEcoRIで消化後、Mung Bean Nuclease(宝酒造株式会社、カタログ番号2420A)で処理し、フラグメント1の開始コドン側にT4DNA Ligase(宝酒造株式会社、カタログ番号2011A)で結合させ、pKK223-3のrrnBT₁T₂ターミネーター領域を制限酵素SalIとSspIで消化し、SalIで消化したフラグメント1の終止コドン側に結合させ、pUC18のSmaI部位に組み込むことにより、本タンパク質の生産のための発現ベクター{pKOT245(受託番号微工研寄第P-14895号)}(図4)を構築した。pKOT245のDNAの長さは3.7kbである。作製した本タンパク質発現ベクターは、Pharmacia ALF DNA シークエンサーによりその塩基配列の決定を行った。

(3) 形質転換

形質転換は、Kushnerらの塩化ルビジウム法(Genetic Engineering, p.17, El

sevier (1978)) に従った。即ち、p K O T 2 4 5 を宿主大腸菌 W 3 1 1 0 M へ上記の手法に従い移入し、本タンパク質生産大腸菌とした。

【0025】

2. 培養

(1) 培養

本タンパク質発現大腸菌を改変 S O C 培地 (Bacto tryptone 20 g/l, Bacto yeast extract 5 g/l, NaCl 0.5 g/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.03 g/l, Glucose 3.6 g/l) で前培養し、生産用培地 (Bacto tryptone 5 g/l, Citric acid 4.3 g/l, K_2HPO_4 4.675 g/l, KH_2PO_4 1.275 g/l, NaCl 0.865 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{nH}_2\text{O}$ 0.5 mg/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/l, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.225 mg/l, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.1 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.25 mg/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2 g/l, Thiamine HCl 5.0 mg/l, Glucose 3 g/l) 5 L に対し菌体懸濁液を 100 ml 添加し、10 L の培養槽で通気攪拌しながら培養し、対数増殖前期 ($\text{OD}_{550}=5.0$) に達した段階で 1 mM の濃度でイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを添加し、さらに OD_{550} が 150 に達するまで培養した。培養中、温度は 32℃、pH はアンモニアを添加することにより 7.15 に制御し、溶存酸素濃度の低下を防ぐために攪拌速度をあげることで空気飽和の 50% に溶存酸素濃度を制御した。また、高菌体濃度とするために溶存酸素濃度の急激な上昇を指標として、50% グルコース溶液を 0.2% 濃度で添加しながら培養した。

(2) 大腸菌インクルージョンボディの調製

上記方法により得られた培養液を遠心して菌体を回収し、10 mM エチレンジアミン四酢酸を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液を (pH 7.3) に懸濁し菌体破碎装置 (ゴーリン社製) を用いて細菌を破碎し、再度遠心してインクルージョンボディを含む沈殿を回収した。

【0026】

3. 精製

(1) 大腸菌インクルージョンボディの可溶化

大腸菌インクルージョンボディを 1% Triton X-100 で 3 回洗浄後、3000

×gで30分間、4℃で遠心し、得られた沈殿を20mM Tris-HCl緩衝液、pH8.3、8M尿素、10mM DTT、1mM EDTAで超音波をかけながら可溶化した。

(2) 単量体精製

その可溶化液を20000×gで30分間、4℃で遠心し、その上清を回収した。得られた上清を20mM Tris-HCl緩衝液pH8.3、6M尿素、1mM EDTAで平衡化したSP-Sepharose FF（ファルマシア社）に通し、同溶液で洗浄後、0.5M食塩を含む同溶液で溶出させた。溶出液にNa₂SO₃とNa₂S₄O₆をそれぞれ最終濃度が111mM、13mMになるように加え4℃、15時間スルホン化を行った。スルホン化溶液を20mM Tris-HCl緩衝液、pH8.3、6M尿素、0.2M食塩、1mM EDTAで平衡化したSephacryl S-200（ファルマシア社）でゲル濾過を行い、単一なスルホン化された本タンパク質単量体を得た。

(3) リフォールディング

スルホン化された本タンパク質単量体の溶液に9倍量の50mM Na-Glycine緩衝液pH9.8、1M塩化ナトリウム、30mM CHAPS、5mM EDTA、2mM GSH（還元型グルタチオン）、1mM GSSG（酸化型グルタチオン）を加えた後、3日間、4℃で攪拌しリフォールディングを行った。

(4) 二量体精製

リフォールディングされた試料を0.05%TFA、25%アセトニトリルで平衡化しておいた逆相HPLCのRESOURCE RPCカラム（ファルマシア社）に通し、0.05%TFA、25～45%アセトニトリルグラジェントにより溶出した。溶出液は吸光度計を用い280nmの吸光度によりモニターした。MP52二量体画分を回収し、凍結乾燥した。これを20mM Tris-リン酸緩衝液、pH8.0、8M尿素、1M食塩で平衡化しておいたSephacryl S-200でゲル濾過を行った後、本タンパク質二量体画分を上述と同様の条件で逆相HPLCのRESOURCE RPCカラムに通し精製された本タンパク質二量体画分を得た。

【0027】

(5) 精製された本タンパク質の物理化学的性質の測定

(ア) N末端アミノ酸配列分析

上記で得られた精製された本タンパク質につき、N末端アミノ酸配列をアミノ酸シーケンサー、モデル476A（アプライドバイオシステムズ社）により分析したところ、配列表配列番号1で示すN末端から30番目までのアミノ酸配列が確認された。

(イ) アミノ酸組成分析

上記で得られた精製された本タンパク質のアミノ酸組成をアミノ酸分析機〔PICOTAGシステム（ウォーターズ社）〕により調べた。その結果を表3に示す。表に示された数は1モノマー当りのアミノ酸残基数を示す。

【表3】

アミノ酸	実測値	期待値
Asx	11.5	12
Glx	10.9	11
Ser	8.4	9
Gly	4.3	4
His	4.0	4
Arg	7.7	7
Thr	5.4	6
Ala	7.3	7
Pro	10.2	10
Tyr	2.9	3
Val	5.7	7
Met	5.1	4
1/2Cys	2.6	7
Ile	4.9	6
Leu	10.0	10
Phe	4.0	4
Lys	5.9	6
Trp	—	2
配列の長さ		119

—：検出不可能

(ウ) 電気泳動による分析

上記で得られた精製された本タンパク質の分子量を非還元条件下のSDS-P

AGEにより確認したところ、約28KDaの分子量を示した。

上記(ア)、(イ)および(ウ)に示された結果より、本タンパク質はN末端が単一にProから始まる119残基からなるタンパク質であることが解った。

【0028】

【発明の効果】

本発明にかかる軟骨・骨誘導性修復用材料は、外科的手術を必要としない骨折治療法において、生体吸収性が高く、有効成分である骨誘導因子との親和性が良く、温度によってゾルーゲル可逆変化を起こすことから操作が簡便なうえ、患者に外科的手術による苦痛を与えることなく患部に投与できる。これにより骨誘導因子の薬効を持続させ、さらには副作用の少ない軟骨・骨誘導性修復用材料が提供できる。

【0029】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：119

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：

生物名：ヒト (homo sapiens)

組織の種類：ヒト胎児

配列の特徴：

存在位置：

他の情報：MP52アミノ酸配列の383番目から501番目のアミノ酸配列

配列：

CCA CTG GCC ACT CGC CAG GGC AAG CGA CCC AGC AAG AAC CTT AAG GCT	48
Pro Leu Ala-Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala	
5 10 15	
CGC TGC AGT CGG AAG GCA CTG CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG GGC TGG	96
Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp	
20 25 30	
GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC CTT GAG TAC GAG GCT TTC CAC TGC GAG	144
Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu	
35 40 45	
GGG CTG TGC GAG TTC CCA TTG CGC TCC CAC CTG GAG CCC ACG AAT CAT	192
Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His	
50 55 60	
GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA CCA	240

Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro
 65 70 75 80
 CCC ACC TGC TGT GTG CCC ACG CGA CTG AGT CCC ATC AGC ATC CTC TTC 288
 Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe
 85 90 95
 ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG GTG TAT AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC 336
 Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val
 100 105 110
 GTG GAG TCG TGT GGC TGC AGG 357
 Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg

115

【0030】

配列番号：2

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：MP52成熟型単離用順方向PCRプライマー。

配列：

ATAATGCCAC TAGCAACTCG TCAGGGC 27

【0031】

配列番号：3

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

株名：なし

配列の特徴：MP 52 成熟型単離用逆方向PCRプライマー。

配列：

CGTCGACTAC CTGCAGCCAC ACGACT 26

【図面の簡単な説明】

【図1】

アデカ^(R)プルロニックの分類図である。横軸はポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の総分子中のエチレンオキサイドの含量を重量%で表し、縦軸はポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の構成成分のポリプロピレングリコールの分子量を表す。

【図2】

実施例4で得られたマウスの右後足大腿部の骨・軟骨石灰化組織の軟X線写真である。(a)はアデカ^(R)プルロニックF-127のみ、(b)はMP52含有アデカ^(R)プルロニックF-127をそれぞれ投与後2週間に撮影した。筋肉内に黒く見える部分が異所性に形成された骨である。

【図3】

実施例4で得られたマウスの右後足大腿部の非脱灰切片の組織染色顕微鏡写真である。フォンコッサ(von-Kossa)染色(a)において骨基質の形成が、ヘマトキシリン-エオシン(Hematoxylin-Eosin)染色(b)において骨芽細胞をともなった骨基質の形成および骨髄の形成が確認される。

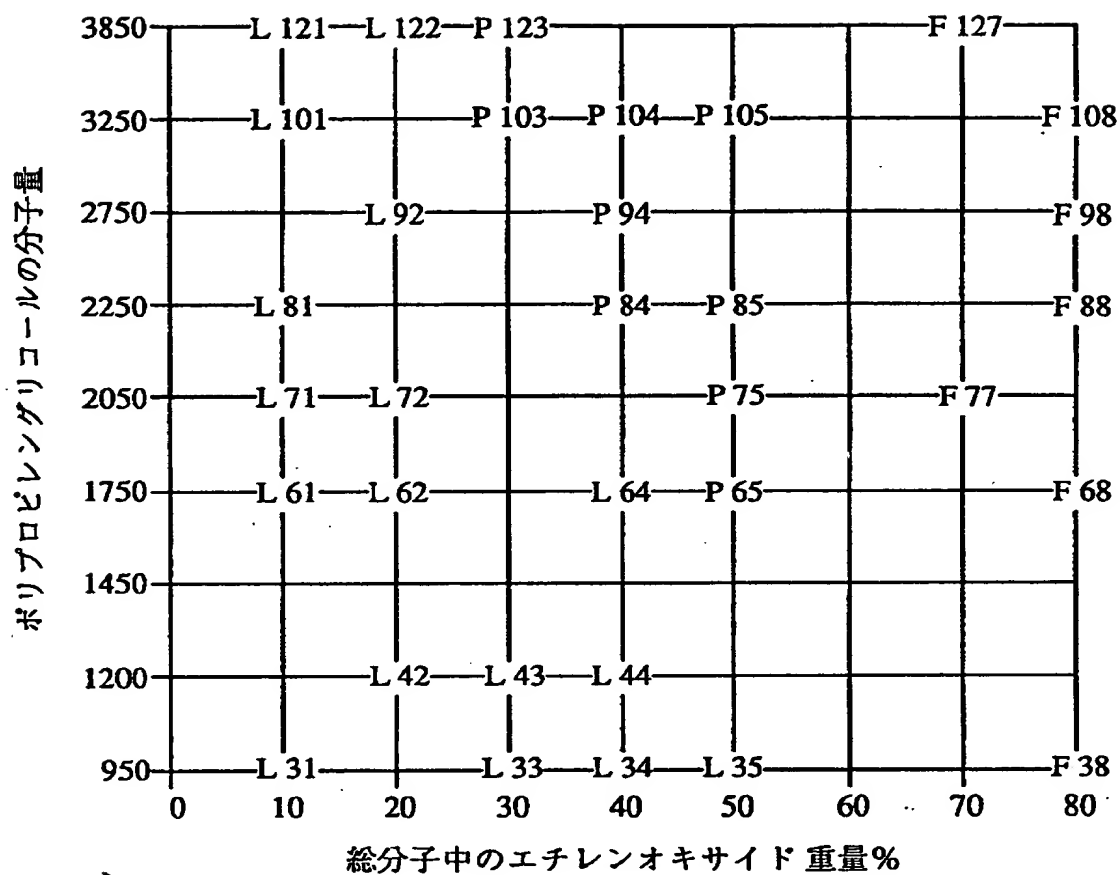
【図4】

参考例1(2)で得られたタンパク質MP52の発現ベクター(pKOT245)のプラスミドマップである。

【書類名】

図面

【図1】



【图2】

写真用代用面図

(a)



(b)



【图3】

図面代用写真

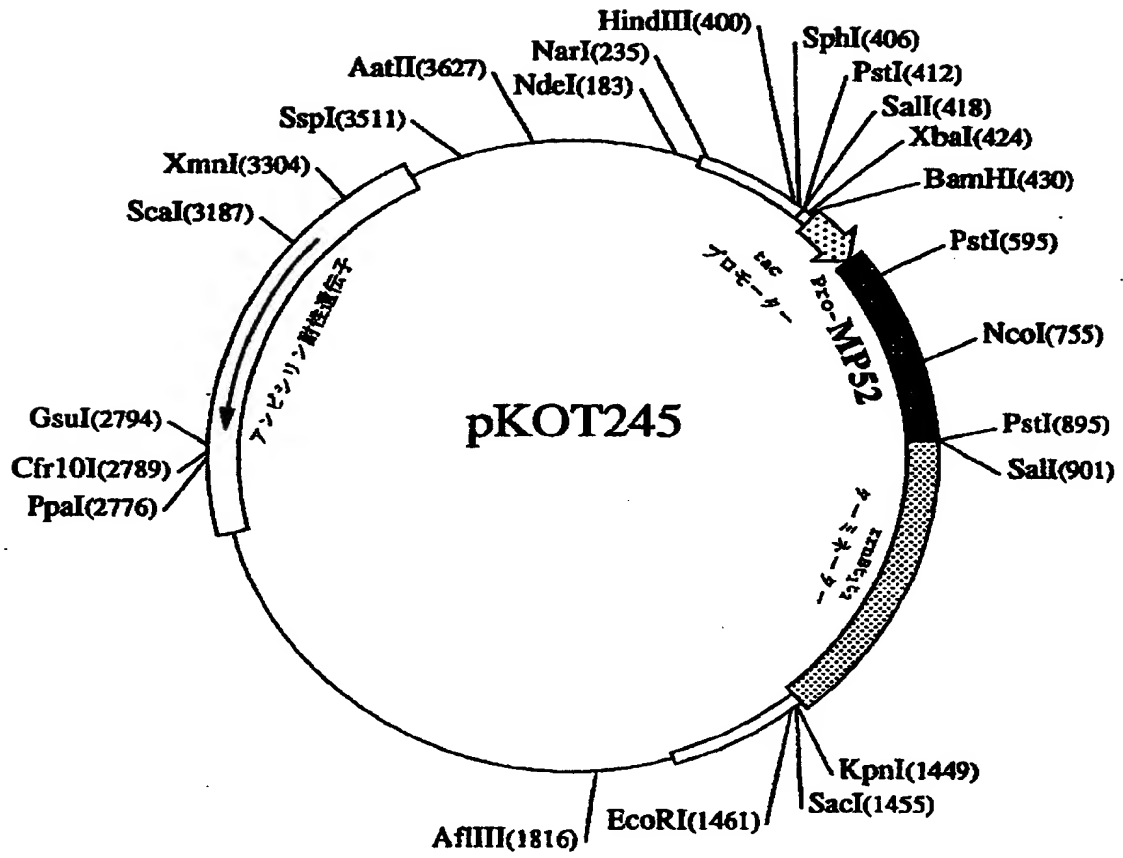
(a)



(b)



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 外科的手術を必要としない軟骨・骨誘導方法において使用され、骨誘導因子と、生体吸収性が高く骨誘導因子との親和性が良く温度によってゾル-ゲル可逆変化を起こす担体とからなる軟骨・骨誘導性修復用材料を提供する。

【解決手段】 骨誘導因子とポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類とからなり、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の構成組成であるポリプロピレングリコールの分子量が約1500から4000およびエチレンオキサイドの重量比が約40～80％／分子の範囲にあり、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の対水溶液濃度が約10～50％である軟骨・骨誘導性修復用材料。

【効果】 本発明者らは外科的手術を必要としない骨誘導方法において骨誘導因子を有効成分とし、担体としては生体吸収性が高く骨誘導因子との親和性が良く温度によってゾル-ゲル可逆変化を起こす種類のポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類からなる軟骨・骨誘導性修復用材料を提供するものであり、本発明の軟骨・骨誘導性修復用材料は骨誘導因子の薬効を持続させ、さらには抗原性等の副作用の少ない軟骨・骨誘導性修復用材料を提供する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000113137
【住所又は居所】 東京都港区赤坂8丁目10番16号
【氏名又は名称】 ヘキストジャパン株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100091731
【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル
すばる特許事務所
【氏名又は名称】 高木 千嘉
【代理人】 申請人
【識別番号】 100087930
【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル
すばる特許事務所
【氏名又は名称】 佐藤 辰男
【代理人】 申請人
【識別番号】 100080355
【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル
すばる特許事務所
【氏名又は名称】 西村 公佑

特平 7-322402

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000113137]

1. 変更年月日	1990年 8月30日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都港区赤坂8丁目10番16号
氏 名	ヘキストジャパン株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)